Versuche zur Isolierung von Metallogenium personatum Perf.

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Gottfried Reimann

Saarbrücken

1971

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof.Dr.med., Dr. phil., Dipl.-Chem.W.Zimmermann

Titel der Arbeit

Versuche zur Isolierung von Metallogenium personatum Perf.

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
1970

vorgelegt von
Gottfried Reimann
geb. am 2. Juni 1941 in Breslau

Dekan: Prof. Dr. med. G. Dhom
Referent: Dr. rer. nat. R. Schweisfurth, Priv. Doz.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Prüfung wurde am 5.Februar 1971 abgelegt.

Versuche zur Isolierung von Metallogenium personatum Perfilev

Literatur und Fragestellung:

Der sowjetische Mikrobiologe PERFILEV beschrieb einen neuen manganoxydierenden Mikroorganismus, dem er in seinen Veröffentlichungen (1961) den Namen Metallogenium personatum Perfilev gab.

Kolonien dieses Organismus hatte PERFILEV erstmals 1937 gesehen. Es gelang ihm damals jedoch nicht, Zellstrukturen nachzuweisen, die für die Bildung der Manganoxide verantwortlich gemacht werden konnten, so daß er diese Formen aus Manganoxiden Metallogenium invisum benannte.

GUSEVA (1956) hatte diesen Mikroorganismus auch beobachtet, jedoch ebenfalls ohne ihn zu benennen.

PERFILEV beschrieb diesen neuen Organismus wie folgt (aus "Applied Capillary Microscopy", 1965):
Description of Metallogenium personatum: Polymorphous, accumulatung mainly manganese and partly iron; a small coccoid microbe (about 0,5 μ) with a complex life cycle involving an alternation of a unicellular stage in the form of a round cell of large diameter (about 0,8 μ) which can change into both a motile flagellate zoogonidium and diverse forms of nonmotile microcolonies, usually firmly attached to the surface of the solid substrate or occasionally passing into the plankton. On becoming attached the solitary Metallogenium cell can divide

and sprout to produce the second stage, a single or verticillate trichospherical microcolony consisting of radiating, slightly sinuos, filamentous, blackish-brown processes, tapering toward the tips. The radial processes (after removal of the masking deposits) consist of single chains of coccoid cells, connected to one another by very fine threads, and occasionally merely of a thread with reproductive cells on the ends. In the following zoogleal stages, depending on the chemistry of the mud solution, the microcolonies may develop in the form of dense zoogleа-radial-lobate, clavate, or irregular round-lumpy forms heavily masced by manganese deposits (third stage), or in the form of loose zooglea consisting of a single layer of cells attached to the solid substrate and with a zoogleal-branched or zoogleal-reticulate form of growth (fourth stage).

The species M. personatum Per. processes characteristics of the genus.

Changes in the chemistry of the environment may lead to the omission of certain stages, but at all stages Metallogenium can form motile solitary cells.

Abb. 1: Stadien von M. pers. (aus "Applied Capillary Microscopy", Perfilev u.a., 1965): 1-4: Beginn des trichosphärischen Stadiums; 5: Beginn der Reproduktionszellenbildung; 6-9: Beginnende Mineralisation.

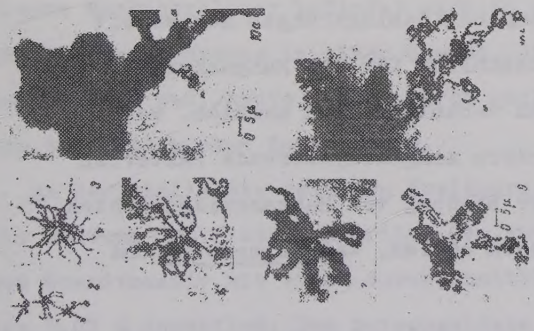

Abb. 2: (aus "Applied Capillary Microscopy", Perfilev u.a., 1965): Verschiedene Stadien von M. pers. nach Einwirken von Oxalsäure und anschließender Färbung mit Karbol-Gentiana-Violett.

PERFILEV wies M. pers. in zahlreichen Süßwasserseen des europäischen Teils der Sowjetunion nach. Um das Verhalten von M. pers. besser beobachten zu können, benutzten PERFILEV und GABE (1961) die sogenannte "Kapillarmethode" zur Untersuchung manganhaltiger Schlämme. Dabei werden Kapillaren in den Schlamm versenkt, nach ein- bis eineinhalb Monaten wieder entfernt und direkt unter dem Mikroskop betrachtet. Dadurch entfällt die beim Schöpfen der Proben übliche Durchmischung der Schlammprofile. Nachteilig mag dabei die Tatsache sein, daß es sich bei den Kulturen in den Kapillaren nicht um Reinkulturen handelt.

1964 versuchten PERFILEV und GABE zu klären, ob bestimmte Mikroorganismen bei der Ablagerung von Mangan- und Eisenerzen eine besondere Rolle spielen. Sie fanden in den schichtweisen Manganoxidablagerungen massenhaft M. pers., das sie hauptsächlich für die Manganoxidablagerungen in Seeschlämmen verantwortlich machten. Neben M. pers. wurden auch andere manganoxydierende Bakterien beschrieben, die bei der Bildung von Manganoxidschichten in Seen von Bedeutung sein sollen, wie Kusnezovia und Caulococcus.

PERFILEV konnte eine Vermehrung von M. pers. auf Agarmedien (Medium A nach Bromfield und modifiziertes Medium nach Lieske) nach ein- bis eineinhalb Monaten Bebrütung beobachten, wobei deutlich sichtbare feine Niederschläge von Manganoxiden gebildet wurden. Die typischen Kolo-

nien sollen dabei das Aussehen von unregelmäßigen, gelappten, braunen Flecken haben. Eine Vermehrung auf Fleischextraktagar blieb aus, was damit erklärt wurde, daß die heterotrophe Mikroflora M. pers. vollständig überwucherte. Offenbar benutzte PERFILEV bei der Überimpfung auf Fleischextraktagar keine Reinkulturen von M. pers.

KALINENKO (1952) hatte auch versucht, diesen Mikroorganismus aus Schlämmen auf Fleischextraktagar zu isolieren, jedoch ohne Erfolg. PERFILEV erklärte dieses negative Ergebnis damit, daß die Kulturen von M. pers. nicht lange genug bebrütet worden sein und außerdem durch die Begleitflora überwuchert wurden.

SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA beschäftigten sich 1966 mit der Beteiligung von Mikroorganismen an der Bildung oxydierter Manganerze in den Lagerstätten von CIATURA. Dieses Manganerzlager befindet sich in der Nähe der Küste des Schwarzen Meeres in einer Gegend, die früher von Wasser bedeckt war, heute jedoch durch geologische Umbildungen zum küstennahen Land gehört.

An der Stelle des jetzigen Erzlagers befand sich früher die Mündung des Flusses Kwirila, der zuvor ein ausgedehntes Granitmassiv mit einem durchschnittlichen Mangangehalt von 0,07 % durchfloß. Das herausgelöste Mn^{2+} wurde in die Küstenzone transportiert und nach der Meinung von SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA durch die Tätigkeit von Mikroorganismen in Form von Manganoxidschichten abgelagert. Heutzutage befindet sich auf den Schichten von Manganoxiden eine Schicht Mangancarbonat, in der der Vorgang der

Oxydation durch Mikroorganismen weiterlaufen soll.

Außerdem wurde M. pers. auch in Schichten oxydierten Manganerzes gefunden, zusammen mit manganreduzierenden Bakterien, die nach Ansicht der Autoren durch Reduktion der Manganoxide das Vorhandensein von M. pers. ermöglichen.

SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA (1966) gaben sieben Medien an, die nach ihren Erfahrungen eine gute Vermehrung von M. pers. gewährleisten sollen (Tab. 2, S. 8).

Da der Mikroorganismus M. pers. in der Sowjetunion sehr verbreitet sein soll, wie aus den Veröffentlichungen der Autoren zu entnehmen ist, wollten wir versuchen, M. pers. auch außerhalb der Sowjetunion nachzuweisen und gegebenenfalls in Reinkultur zu züchten. Mit den Reinkulturen sollte überprüft werden, ob auch von uns M. pers. als kokkenförmiger Mikroorganismus erkannt werden kann oder ob die fädigen Manganoxide von stäbchenförmigen Mikroorganismen oder manganoxydierenden Pilzen herrühren; von beiden Mikroorganismen ist bekannt, daß sie außerhalb der Zellen und bei Pilzen auch in weiterer Entfernung vom Mycel fädige Manganoxide zu bilden in der Lage sind (Schweisfurth, 1968).

Das Vorliegen einer neuen Art von Mikroorganismen, die Mangan oxydieren, wäre auch für die Bildung von Manganoxiden in den Wasserversorgungsanlagen (biologisch arbeitende Entmanganung und Rohrleitungen) von besonderem Interesse.

Methodik:

Es wurden insgesamt 40 verschiedene Schlamm- und Erzproben aus Seen, Flüssen, Bächen, Brunnen und Erzlagern gesammelt. Die manganerzhaltigen Proben wurden Eisenerzlagern des Siegerlandes entnommen, da dort das Eisenerz zum Teil erhebliche Beimengungen von Mn^{2+} aufweist. Da die meisten Gruben nach 1945 geschlossen wurden, mußten die Proben den Abraumhalden entnommen werden, so daß sie mindestens drei Jahre der Witterung ausgesetzt waren (Tab. 1).

Tab. 1: Herkunft und Zahl der verwendeten Proben.

Herkunft der Proben:	Zahl:
Fluß- und Bachschlamm	12
Talsperrenschlamm	3
Brunnenschlamm	11
Seeschlamm	5
Erz-manganhaltig	5
Ostseeschlamm	4
Gesamtzahl der Proben:	40

Alle Proben wurden auf die sieben von SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA angegebenen Medien ausgeimpft, von denen sich besonders die Medien B und F für eine Vermehrung von *M. pers.* eignen sollen (Tab. 2, S.8).

Tab. 2: Medien für die Kultur von M. pers. nach SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA (1966), in g/l.

Medien:	A	B	C	D	E	F	G
Mn-acetat	0,1	-	-	-	-	-	-
$MnCO_3$	-	2,0	-	-	2,0	-	-
$MnSO_4$	-	-	0,1	0,1	-	-	-
Mn-Erz[1]	-	-	-	-	-	-	20,0
Mn $(HCO_3)2$[2]	-	-	-	-	-	100,0	-
NH_4MgPO_4	-	-	-	-	0,05	-	-
KH_2PO_4	-	-	0,01	0,01	-	Sp.	-
$NaHCO_3$	-	-	-	0,01	-	0,01	-
$(NH_4)2SO_4$	-	-	-	-	-	0,01	-
$MgSO_4$	-	-	-	-	-	Sp.	-
Stärke3)	-	-	2,0	-	-	-	-
Agar-Agar[4]	15,0	15,0	15,0	15,0	1,0	0,5	0,5
Wasser[5]	1000	1000	1000	1000	1000	900	1000
pH	7,2	7,0	6,5	7,0	7,5	7,2	7,5

1) Rhodochrosit

2) 100 ml gesättigte Mn (HCO_3) 2-Lösung

3) Stärke wasserlöslich (Merck)

4) Oxoid-Agar Nr. 3

5) Leitungswasser.

Der pH-Wert der Medien wurde nach Lösung des Agar-Agars mit Hilfe eines pH-Meters der Firma METROHM eingestellt, wobei die Medien eine Temperatur von 50°C hatten (die Temperatur von 50°C wurde durch entsprechende Eichung des Gerätes auf Normalbedingungen kompensiert). Zur Herstellung von 100 ml gesättigter $Mn(HCO_3)_2$-Lösung für das Medium F gaben wir 2,0 g $MnCO_3$ in 100 ml Wasser und begasten diese Suspension mit CO_2 (spezifische Angaben der Autoren fehlten).

Außerdem wurden die Medien E,F und G zusätzlich dahingehend abgeändert, daß sie durch Zugabe von 15,0 g/l Agar-Agar verfestigt wurden und so auch in Petrischalen ausgegossen werden konnten.

Von den Originalmedien E-G wurden zur Beimpfung jeweils 10,0 ml in sterile Reagenzgläser abgefüllt.

Das Medium nach MULDER und VAN VEEN verändert nach SCHWEISFURTH (1968) diente zur Kontrolle, um andere manganoxydierende Bakterien zu erfassen.

Zusammensetzung: $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ - 0,15 g; $MnCO_3$ - 1,0g; Hefeextrakt - 0,075g; $C_6H_5Na_3O_7 \times 2\ H_2O$ - 0,15g; $Na_4P_2O_7 \times 10\ H_2O$ - 0,05g; Agar-Agar - 10,0g; Aqua-bidest. - 1000,0; pH - 6,8.

Von jeder Originalprobe wurden 0,1 ml Schlamm oder 0,1 ml einer Suspension der Gesteinsproben auf jedes Medium von SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA ausgestrichen oder Reagenzgläser mit den halbflüssigen Medien E,F und G beimpft.

Proben, bei denen nach der Erstausimpfung Wachstum und Vermehrung von manganoxydierenden Bakterien zu erkennen waren, wurden auf das gleiche Medium übertragen, um eine weitere Anreicherung von manganoxydierenden Bakterien zu erhalten. Weitere Rohkulturen wurden nach jeweils 2-4 Wochen angelegt. In gleicher Weise wurde mit dem Kontrollmedium verfahren. Mittels Dreiösenausstrichs wurden Einzelkolonien erhalten. Zur mikroskopischen Untersuchung wurden aus den festen und halbflüssigen Medien Proben entnommen und auf Objektträger mikroskopiert, anschließend das gebildete Manganoxid mittels Benzidinprobe (Methode zum Nachweis von Mn^{4+} nach BROMFIELD 1956 und HACKL 1962) nachgewiesen, außerdem das gebildete Manganoxid reduziert und gelöst.

Wurden bei der mikroskopischen Betrachtung der Kulturen Strukturen erkannt, die die Vermutung aufkommen ließen, daß es sich um zwei verschiedene manganoxydierende Mikroorganismen handeln könnte, wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe festgestellt, ob bei den verschiedenen Verdünnungen unterschiedliche manganoxydierende Mikroorganismen gefunden werden konnten. Um bei der mikroskopischen Betrachtung der Kulturen nicht durch die gebildeten Manganoxidniederschläge, die unter Umständen Zellstrukturen verdekken können, gestört zu werden, wurden Kulturproben auf dem Objektträger mit 10 %-iger Oxalsäure oder 5 %-iger Natriumascorbatlösung behandelt und anschließend mit Karbol-Gentiana-Violett gefärbt.

Alle Reinkulturen wurden abschließend auf Fleischextraktagar überimpft. Im Falle einer Vermehrung auf Fleischextraktagar wurden die Kolonien wieder auf die manganhaltigen Medien rücküberimpft.

Ergebnis der Untersuchungen:

Von den insgesamt 40 für die Untersuchungen zur Verfügung stehenden Proben waren bei 20 Proben auf den Medien von SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA und auf dem Kontrollmedium manganoxydierende Mikroorganismen nach der Erstausimpfung nachzuweisen. Dabei konnten sowohl von Proben aus Flüssen, Bächen, Talsperren, Seen und aus erzhaltigem Gestein manganoxydierende Bakterien kultiviert werden (Tab. 3).

Tab. 3: Herkunftsorte der Proben mit manganoxydierenden Bakterien.

Nr.	Herkunftsort:
1	Lippe bei Lünen
2	Ruhr bei Dortmund-Geiseke
4	Möhnetalsperre
5	Möhne oberhalb der Talsperre
HOI	Blies bei Homburg/Saar
RhI	Rhein bei Worms
RhII	Rhein oberhalb Köln
Fl	Leine bei Wunstorf
2F	Weser bei Hameln
173	Pumpwerk Dortmund-Geiseke
A5	Brunnen aus Pumpwerk Frankenthal
A7	Brunnen bei Wolfenbüttel
A9	Brunnen bei Lünen
26/12	Abraum der Grube Wingestedt

Nr.	Herkunftsort:
22/7	Abraum der Grube Huth
21/5	Abraum der Grube Eisenhardt
A12	Steinhuder Meer bei Hannover
3	See bei Dortmund-Lanstrop
6	See bei Dortmund-Derne
7	Lütjensee bei Hamburg

Die Proben, bei denen manganoxydierende Bakterien nachgewiesen werden konnten, zeigten Wachstum und Vermehrung von manganoxydierenden Bakterien nur auf jeweils einzelnen Medien (Tab. 4).

Tab. 4: Verteilung der Vermehrung manganoxydierender Bakterien auf den einzelnen Medien.

Nr.	A	B	C	D	E	F	G	E^1	F^1	G^1	$7/3^2$
1	+	+			+	+		+	+		+
2					+	+	+	+	+	+	+
4		+	+	+	+	+		+	+		+
5		+	+	+	+	+		+	+		+
HOI[3]					+		+	+		+	+
RhI	+				+	+	+	+		+	+
RhII					+	+	+	+			+
F1					+	+					+
2F					+	+					+
173[3]				+	+	+	+				+
A5[3]			+		+						+

Nr.	A	B	C	D	E	F	G	E^1	F^1	G^1	$7/3^2$
A7					+						+
A9					+						+
$A12^3$		+			+						+
26/12	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
$22/7^3$	+		+		+	+	+	+	+		+
$21/5^3$	+		+		+	+	+	+	+	+	+
3		+		+	+						+
6		+	+		+	+	+	+		+	+
7					+	+	+				+

1) durch Agar-Agar verfestigte Medien.

2) Kontrollmedium nach MULDER und VAN VEEN verändert nach SCHWEISFURTH.

3) mit manganoxydierenden Pilzen.

In sechs Proben wurden gleichzeitig mit manganoxydierenden Bakterien auch manganoxydierende Pilze mit einem guten Wachstum festgestellt; außerdem wuchsen fast regelmäßig schleimbildende Bakterien, die die Isolierung manganoxydierender Bakterien erschwerten.

Die Kolonien manganoxydierender Bakterien wurden jeweils mehrfach mit Hilfe des Dreiösenausstrichs überimpft, wobei sich herausstellte, daß zwar ein Teil der Begleitflora, die bei der Isolierung der Kolonien mitüberimpft wurde, unverändert gut weiterwuchs, die manganoxydierenden Bakterien auf den einzelnen Medien von SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA jedoch eine deutlich

unterschiedliche Vermehrungstendenz zeigten, die auch nicht durch verlängerte Bebrütungszeiten ausgeglichen werden konnte (Tab. 5, S. 16).

Insgesamt konnten auf den Medien A-D nach der ersten Subkultur nur noch bei sechs Proben manganoxydierende Bakterien nachgewiesen werden. Auf den halbflüssigen Medien E-G war dies noch in neunzehn Fällen möglich. Auf den festen Medien E-G konnten manganoxydierende Bakterien in zehn Proben nach der ersten Überimpfung erkannt werden. Auf dem Kontrollmedium zeigten nach der ersten Überimpfung zwanzig Proben Manganoxydation.

Nach der zehnten Überimpfung betrug die Zahl der sich noch vermehrenden Kulturen auf allen Medien von SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA zusammen nur noch zehn. Auf dem Kontrollmedium zeigten ebenfalls zehn Kulturen der gleichen Proben Vermehrung und Manganoxydation. Eine Wertbestimmung der einzelnen Medien kann aus der Tabelle 5 entnommen werden (Tab. 5, S. 16).

Es ist zu erkennen, daß zumindest die Medien A-D und G für die Vermehrung der von uns gefundenen manganoxydierenden Mikroorganismen keine günstigen Bedingungen bieten im Vergleich zu dem Kontrollmedium.

Tab. 5: Aufschlüsselung der positiven Proben für die einzelnen Medien.

Medien	Rohkultur	1. Subkultur	2. Subkultur	10.Subk.
A	6[1]	4[2]	-	-
B	5	3	-	-
C	6	3	-	-
D	4	2	-	-
E	20	18	14	6
F	14	10	7	5
G	10	6	3	-
E[3]	11	9	8	7
F[3]	7	6	5	-
G[3]	6	5	-	-
Kontroll-medium	20	20	19	10

1) Von den insgesamt 20 Proben mit manganoxydierenden Bakterien wuchsen bei der Rohkultur auf dem Medium A 6 Proben.

2) Von den bei der Rohkultur positiven Proben wuchsen bei der ersten Subkultur noch Bakterien aus 4 Proben.

3) Durch Agar-Agar verfestigte Medien.

Die Medien von SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA sind bezüglich der Zusammensetzung recht arm, da das Milieu außer an Verunreinigungen des Agar-Agar und den Inhaltsstoffen des Leitungswassers keine organischen C-und N-Quellen besitzt. Es wurden deshalb einige Versuche über die Notwendigkeit des Fehlens oder Vorhandenseins von Bestandteilen in den Medien durchgeführt.

1. Bei den Medien E und F wurden die organischen Stickstoffquellen (NH_4MgPO_4 bzw. $(NH_4)_2SO_4$) weggelassen und mit Reinkulturen beimpft. Es fand zwar eine Vermehrung der ausgeimpften Bakterien statt, die aber nach der 4. Subkultur eingestellt wurde (zur Kontrolle wurden jeweils Kulturen der unveränderten Medien angelegt, die sich nach der 4. Subkultur noch vermehrten).

2. Wurde den Medien E und F der Agar-Agar entzogen, so hatte das zur Folge, daß sich die manganoxydierenden Bakterien nach der dritten Überimpfung nicht mehr vermehrten.

Hieraus ergibt sich, daß bei Entzug der im Agar-Agar als Verunreinigung enthaltenen C- und N-Quelle eine deutliche Verschlechterung der Vermehrung eintritt.

3. Wurde den Medien E und F (ohne Agar-Agar) eine organische C- und N-Quelle zugesetzt (Hefeextrakt 0,1 g/l), so fand eine gute Vermehrung manganoxydierender Bakterien mit Bildung von Manganoxiden statt.

Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse von 1 und 2.

4. Wurde den Medien A-D und G eine organische C- und N-Quelle zugesetzt (Hefeextrakt 0,1 g/l), konnte eine Vermehrung während vier Überimpfungen beobachtet werden.

Vermutlich sind die Medien A-D und G für die von uns vorgefundenen manganoxydierenden Bakterien zu arm, um ein Wachstum manganoxydierender Bakterien zu ermöglichen.

Bei der Ausimpfung von Reinkulturen manganoxydierender Pseudomonaden, wie sie von SCHWEISFURTH (1968) isoliert wurden, konnte auf den Medien A-D nach der zweiten Überimpfung ebenfalls keine Vermehrung mehr festgestellt werden. Auf den Medien E und F fand dagegen eine Vermehrung noch nach sieben Überimpfungen statt.

Die mikroskopischen Untersuchungen der Bakterien auf den Medien A-D und G von SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA, auf denen M. pers. wachsen soll, ergaben in jedem Fall, in dem Manganoxydation aufgetreten war, das Vorhandensein von gramnegativen Stäbchen, die Mangan oxydierten und in ihrer Form etwas variierten. Die Stäbchen zeigten bis auf zwei Kulturen eine kurze, gedrungene Form, umgeben von angelagertem Manganoxid. Die Größe dieser Stäbchen betrug 0,4 x 0,8 µ (Abb. 3, S. 19).

Längere und dünnere Stäbchen fanden sich bei zwei Kulturen, wobei sich deren Kolonien durch ihr Aussehen von den Koloniformen der anderen manganoxydierenden Stäbchen unterschieden.

Die kürzeren, plumpen Stäbchen waren in scharf begrenzten, dunkelbraunen Kolonien zu finden, die längeren, dünnen Stäbchen in helleren nicht scharf begrenzten Kolonien. Der Durchmesser beider Koloniformen betrug 0,5 - 1,0 mm, sie waren konvex und metallisch glänzend.

Formen manganoxydierender Bakterien, die den vorgenannten Stadien von M. pers. entsprachen, konnten weder nach zweiwöchiger noch nach fünfwöchiger Bebrütung auf den angegebenen Medien nachgewiesen werden.

Kokkoide Zellen, die Mangan oxydierten, fanden sich ebenfalls weder bei jungen noch bei alten Kulturen.

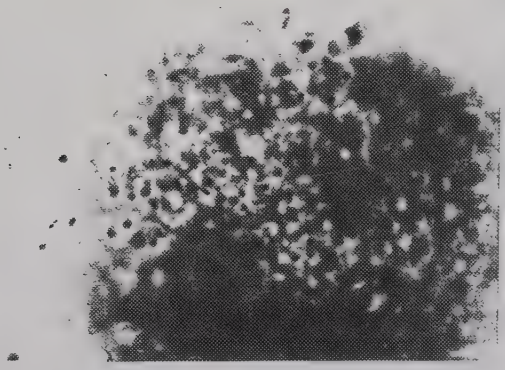

Abb. 3: Manganoxydierende Stäbchen nach Lösung der Manganoxide mit 5 %-iger Natriumascorbatlösung (Phasenkontrast 10 x 90).

Bei der Untersuchung der Kulturen auf den Medien E und F fanden sich sowohl bei der Ausimpfung der Kulturen als auch nach zehnmaliger Überimpfung manganoxydierende Stäbchen. Die Kulturen, die bei der Ausimpfung auf den Medien A-D und G Manganoxydation zeigten und die Kulturen, bei denen auf den Medien E und F manganoxydierende Bakterien gefunden wurden, stammten aus den gleichen Proben.

Bei älteren Kulturen wurden zum Teil Manganoxidschollen gebildet, in die die Stäbchen eingeschlossen waren und ohne Vorbehandlung mit reduzierenden Substanzen nicht sichtbar waren (Abb. 4).

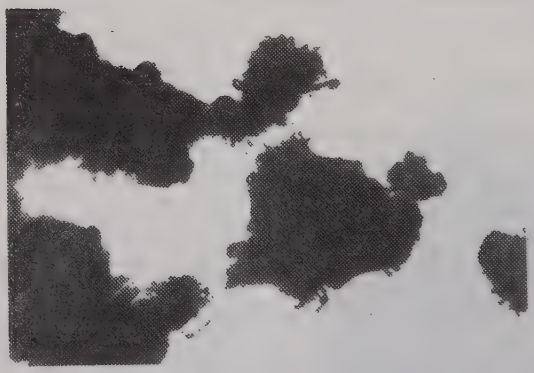

Abb. 4: Manganoxidablagerungen in einer alten Kultur (sechs Wochen alt, Hellfeld 10 x 90).

Die durch Zusatz von 15,0 g/l Agar-Agar verfestigten Medien E,F und G zeigten bei der mikroskopischen Betrachtung der Kulturen ebenfalls eine Vermehrung von manganoxydierenden Stäbchen, die für sechs Proben eine zehnmalige Überimpfung überdauerten. Strukturen, die denen von M. pers. entsprachen, wurden nicht gefunden.

Auch bei Kulturen, die nach einigen Überimpfungen die Vermehrung einstellten, wurden in keinem Fall kokkoide Zellen mit Manganoxydation gefunden. Auf dem Kontrollmedium ließen sich auch nur manganoxydierende Stäbchen nachweisen.

Bei drei Proben wurden jedoch außer den manganoxydierenden Stäbchen vereinzelt Formen gefunden, die dem "trichosphärischen Stadium" von M. pers. ähnelten (Abb. 5). Diese Manganoxidformen ließen in vivo bei Vergrößerungen bis zu 10 x 90 keine Zellformen erkennen. Bei älteren Kulturen war die Fadenstruktur weniger deutlich (Abb.6, S. 22).

Nach Auflösen der Manganoxide mit 10 %-iger Oxalsäure blieben keine Elemente übrig, die den kokkoiden Zellen ähnelten.

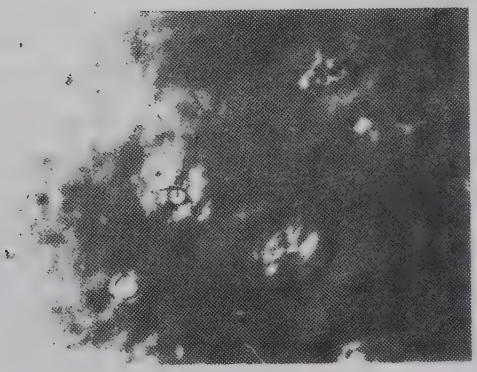

Abb. 5: Von einem Zentrum ausgehende Manganoxidstrukturen Bildmitte (Phasenkontrast 10 x 90, Medium E).

Um auszuschließen, daß eventuell vorhanden gewesene Zellen durch die Behandlung mit 10 %-iger Oxalsäure Schaden genommen haben könnten, wurde auch mit 5 %-iger Natriumascorbatlösung das Manganoxid reduziert. Aber auch

dabei konnten weder kokkoide Zellen noch Plasmafäden zwischen solchen Zellen gefunden werden.

Wurden die in Abb. 5 gezeigten Strukturen länger bebrütet (Abb. 6), so konnte M. pers. dennoch nicht gefunden werden.

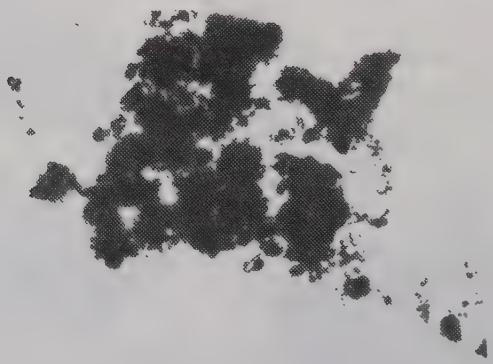

Abb. 6: In Abb. 5 gezeigte Kulturformen nach sechswöchiger Bebrütung (Hellfeld, 10 x 90; Medium E).

Nach der Behandlung mit reduzierenden Substanzen wurden alle Präparate mit Karbol-Gentiana-Violett angefärbt, wie es PERFILEV empfiehlt. Danach waren in keinem Präparat die gesuchten Zellen oder Plasmafäden zu erkennen.

ZAVARZIN (1961) fand bei einer Art von Metallogenium symbiotikum nur fädige manganhaltige Formen; er vertrat die Auffassung, diese Fäden seien lebendig, da er bei mikroskopischer Betrachtung die Bildung beweglicher Zellen durch Knospung an den Enden der Fäden erkennen konnte.

Zuerst soll ein kurzer Stiel aus den Fäden wachsen, auf dem sich dann eine Knospe bildet.

Obligatorisch für das Vorhandensein der beschriebenen Mikroorganismen ist aber nach ZAVARZIN (1961/63) ein nicht näher beschriebener Pilz, an dessen Hyphen die Manganoxidfäden haften. SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA deuteten in ihrer Veröffentlichung (1966) an, daß M. pers. möglicherweise in Symbiose mit Bakterien und Pilzen leben könnte, da dieser Organismus in den Laborkulturen zusammen mit Bakterien und Pilzen gefunden wurde. ZAVARZIN konnte M. symbiotikum nur in Laborkulturen beobachten.

Wir konnten zwar in einigen Proben Kolonien erkennen, die M. symbiotikum ähnelten, aber auch bei sorgfältiger Beobachtung der fädigen Strukturen (im hängenden Tropfen) konnten weder bewegliche Zellen noch eine Knospung von Zellen beobachtet werden. Außerdem fehlte in diesen Kulturen das zu M. symbiotikum gehörende Geflecht von Pilzhyphen.

Die zehn zur Verfügung stehenden Reinkulturen wurden auf Fleischextraktagar überimpft, wo sie zu großen, weißlichen Kolonien heranwuchsen. Die Mikroskopie dieser Kolonien zeigte keine für M. pers. typischen Zellen.

Bei der anschließenden Rücküberimpfung der Kulturen auf manganhaltige Medien erfolgte wieder Manganoxydation, auch bei mehrfacher Weiterüberimpfung.

Diskussion:

In den von uns untersuchten 40 Proben konnten zwar in 20 Proben manganoxydierende Mikroorganismen nachgewiesen werden, diese Mikroorganismen ließen sich jedoch weder nach Kolonieform noch nach Zellform M. pers. zuordnen. Festzustellen ist noch, daß die Mikroaufnahmen von M. pers. ("Applied Capillary Microscopy") von Kulturen aus Kapillaren stammen, die vielleicht ein anderes Milieu darstellen. Nach der Arbeit von SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA war jedoch anzunehmen, daß M. pers. auch außerhalb von Kapillaren in definierten Medien wächst.

Geht man davon aus, daß SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA ihre Kolonien von M. pers. nicht nur als "braune Kolonien" erkannten, sondern auch durch mikroskopische Untersuchungen überprüften, so muß man nach unseren Erfahrungen hinzufügen, daß auch manganoxydierende Pseudomonas-Arten fädige Manganoxide bilden können (SCHWEISFURTH, 1968) ohne gleichzeitiges Vorhandensein von anderen Mikroorganismen (Abb. 7 und 8, S. 25).

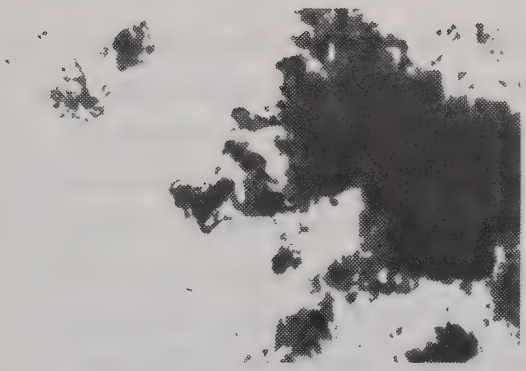

Abb. 7: Kolonien manganoxydierender Stäbchen, die fädige Manganoxidstrukturen bilden (Medium E, halbflüssig; 10 x 90).

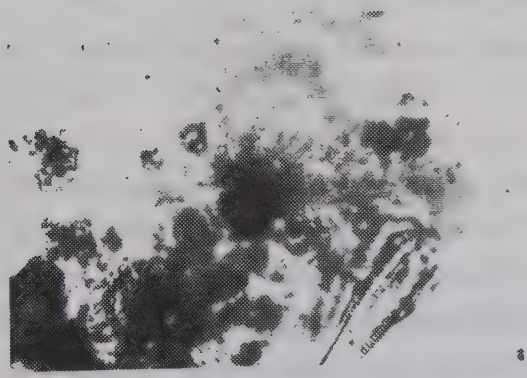

Abb. 8: Manganoxydierende Stäbchen mit fädigen Strukturen (Kultur mit Schlamm im Medium E, halbflüssig; 10 x 90).

Da von SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA keine Mikroaufnahmen ihrer Kulturen vorgelegt wurden, muß ein weiterer Vergleich zwischen den von uns gefundenen manganoxydie-

renden Mikroorganismen und der durch die obengenannten Autoren unterbleiben. Es scheint zudem, daß PERFILEV bei seinen bislang veröffentlichten Versuchen nicht mit Reinkulturen von M. pers. gearbeitet hat, denn er gab an, daß eine Vermehrung von M. pers. auf Fleischextraktagar nicht möglich war, da die heterotrophe Begleitflora eine Vermehrung von M. pers. unterdrückt habe. Der Nachweis von M. pers. nur in Mischkulturen könnte zu der Vermutung Anlaß geben, daß die fädigen Strukturen bei den Untersuchungen von PERFILEV durch andere manganoxydierende Mikroorganismen hervorgerufen wurden.

Wie schon erwähnt, weisen die Medien von SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA zum Teil weder eine C - noch eine N- Quelle auf, außer durch Verunreinigungen im Agar-Agar und im Leitungswasser.

Bei einem Teil der Medien wurde von den Autoren offenbar davon ausgegangen, daß die Fundstätten von M. pers. nicht nur bezüglich C-Verbindungen sondern auch bezüglich N-Verbindungen außerordentlich arm sind.

Für Fundorte in Lagerstätten mag dies auch zutreffen, jedoch ist zu berücksichtigen, daß durch langsame aber kontinuierliche Fließvorgänge auch ständig neue C- und N-Verbindungen herangetragen werden, was bei den statischen Laborkulturen nicht der Fall ist.

Geht man von der Vermutung aus M. pers. sei chemolithotroph, würde der Mangel an C-Verbindungen nicht weiter ins Gewicht fallen. Versuche über die Verwendung fester Medien auf der Grundlage eines Silica-Gels wurden

unseres Wissens nicht vorgenommen.

Da jedoch bekannt ist, daß oligocarbophile Mikroorganismen, zum Beispiel Hyphomicrobium, mit den in der Laborluft vorkommenden C-Verbindungen auskommt, würde ein C-Mangel nicht so schwerwiegend sein wie ein Mangel an N-Verbindungen in der statischen Kultur.

Offenbar sind die von uns isolierten Mikroorganismen, wie wohl M. pers. auch, nicht in der Lage, N_2 zu fixieren, wie die durchgeführten Versuche gezeigt haben. Aus den Versuchen resultiert weiterhin, daß sich sowohl die Medien, die SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA verwendeten als auch das Kontrollmedium nicht für eine Dauerkultur aller primär isolierten manganoxydierenden Mikroorganismen geeignet sind.

Nach den Untersuchungen von SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA wuchsen die aus den Lagerstätten stammenden manganoxydierenden Bakterien immer mit Pilzen oder anderen Bakterien zusammen. Dieses gemeinsame Vorkommen läßt den Schluß zu, daß zumindest von den Bakterien an M. pers. C- und N-haltige Verbindungen hätten geliefert werden können; ein Nachweis hierfür wurde nicht erbracht.

Es stellt sich die Frage, ob M. pers. überhaupt außerhalb von Kapillaren wächst, wobei weniger die Kapillaren als das in den Kapillaren befindliche natürliche Medium (Seeschlamm) für das Wachstum verantwortlich wäre. Dies spräche dann aber sowohl gegen die Ergebnisse von SOKOLO-

WA-DUBININA und DERJUGINA als auch gegen Ergebnisse von PERFILEV.

Es wäre sicher interessant gewesen Proben von M. pers. mit den in unseren Kulturen gefundenen manganoxydierenden Mikroorganismen und deren fädigen manganhaltigen Strukturen direkt vergleichen zu können. Es war uns jedoch nicht möglich, Reinkulturen von M. pers. zu erhalten.

Zusammenfassung:

1.) Metallogenium personatum wurde bei Ausimpfung der Proben auf die Medien von SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA und ein Kontrollmedium durch uns nicht gefunden.

Eine vollgültige Entscheidung, ob Metallogenium personatum überhaupt als Art existiert, konnte nicht gefällt werden, da Referenzstämme nicht erhalten werden konnten.

2.) Auf den von SOKOLOWA-DUBININA und DERJUGINA angegebenen Medien E und F konnten sich entgegen der Angaben der Autoren auch andere manganoxydierende Mikroorganismen vermehren.

3.) Alle durch Isolierung in Reinkultur erhaltenen 10 Stämme manganoxydierender Bakterien wuchsen auch auf Fleischextraktagar; nach Rücküberimpfung auf manganhaltige Medien wurde die Manganoxydation wieder aufgenommen.

4.) In den Rohkulturen wurden vereinzelt fädige Manganoxidstrukturen gefunden. Sie enthielten jedoch keine kokkenförmigen Zellen und waren nicht mit Metallogenium personatum identisch.

Literaturverzeichnis:

BROMFIELD, S.M.: Oxidation of manganese by soil microorganisms.
Austral. J. biol. Sci. 9;238-252 (1956)

GUSEVA, K.A.: On two planctonic microorganisms involved in the iron cycle.
Tr. biol. stantsii "Borok", 2, (1956)

HACKL, O.: Chemisch-mikroskopische Prüfung auf höhere Manganoxide.
Fundamenta Balneo-Bioklimatologica
2, 3-24, (1962)

KALINENKO, V.O.: Geochemical activity of the bacterial colony.
Akad. Nauk. SSSR, ser. geol., 1 (1952)

PERFILEV, B.V.: Absolute geochronology and biogenic ore formation.
Eighteenth International Geological Congress. Abstracts of Papers ONTI NKTP SSSR, (1937)

PERFILEV, B.V. und GABE, D.R.: Capillary Methods of investigating Microorganisms. Izd. Akad. Nauk, SSSR, Moscow, (1961)

PERFILEV, B.V. und GABE, D.R.: The use of the microbial-landscape method to investigate bacteria accumulating manganese and iron in bottom deposits. Nauk Akad. Moscow (1964)

PERFILEV, B.V. und GABE, D.R.: The role of microorganisms in the formation of iron-manganese deposits. Akad. Nauk. SSSR, Moscow, (1964)

SCHWEISFURTH, R. und MERTENS, R.: Mikrobiologische und chemische Untersuchungen über die Bildung und Bekämpfung von Manganschlamm-Ablagerungen in einer Druckleitung für Talsperrenwasser. Arch. Hyg. Bakt. 146, 401-417, (1962)

SCHWEISFURTH, R. und GATTOW, G.: Untersuchungen über Röntgenstruktur und Zusammensetzung mikrobiell gebildeter Braunsteine. Z. Alg. Mikrobiol. 6, 303-308, (1966)

SCHWEISFURTH, R.: Untersuchungen über manganoxydierende- und reduzierende Mikroorganismen. Mitt. Inter. Verein f. Limnologie 14, 179-186, (1968)

SCHWEISFURTH, R.: Ursachen des Auftretens erhöhter Mangankonzentration in Talsperren. Städtehygiene 20, 167-170, (1969)

SOKOLOWA-DUBININA, G.A. und DERJUGINA, S.P.: Die Beteiligung von Mikroorganismen an der Bildung oxydierter Erze im Manganlager von Ciatura. Mikrobiol. (Moskau); 33; 344-348, (1966)

ZAVARZIN, G.A.: Die symbiotische Kultur eines neuen manganoxydierenden Mikroorganismus. Mikrobiol. (Moskau); 30; 393-395, (1961)

ZAVARZIN, G.A.: Knospende Bakterien. Mikrobiol. (Moskau); 30; 965-969, (1961)

ZAVARZIN, G.A.: Der Bau von Metallogenium. Mikrobiol. (Moskau); 32; 1020-1023, (1963)

ZAVARZIN, G.A. und EPICHINA, A.W.: Das symbiotische Wachstum von Metallogenium.
Akad. d. Wissensch. SSSR, 148, 933, (1963)

Übersetzung der sowjetischen Originalliteratur: Osteuropainstitut an der Freien Universität Berlin, Sektion Medizin, Berlin - Dahlem.

Abschließend erfülle ich die angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. med., Dr. phil., Dipl.-Chem. W. Zimmermann und Herrn Dr. rer. nat. R. Schweisfurth für die Überlassung der Arbeit sowie für die Unterstützung durch Rat und Tat bei ihrer Ausführung meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Lebenslauf des Gottfried Reimann

Am 2. Juni 1941 wurde ich als erster Sohn des Arztes Dr. med. Gottfried Reimann und seiner Frau Erika, geborene Kliesch, in Breslau geboren.

Mein Vater befand sich zu dieser Zeit im Kriegsdienst. Bei der Besetzung Schlesiens durch die sowjetischen Truppen mußten meine Mutter, mein zweiter Bruder und ich im Januar 1945 nach Thüringen fliehen. Im Juni 1945 kam mein Vater aus dem Krieg.

In Menteroda, in Thüringen, besuchte ich die Grundschule. Nach dem Umzug nach Erfurt begann meine Oberschulzeit an der Heinrich-Mann-Oberschule.

Im Dezember 1957 flohen wir aus Thüringen über Ost - Berlin nach West-Berlin. Nach der üblichen Wartezeit im Westberliner Auffanglager wurden wir nach Niedersachsen übersiedelt.

Ich besuchte dann in Hannover die Herschelschule, an der ich am 19. Februar 1964 das Abitur ablegte.

Für das Sommersemester 1964 erhielt ich in Saarbrücken einen Studienplatz für das Studium der Medizin. Nach zwei Semestern bestand ich das Vorphysikum und verlegte daraufhin meinen Zweitwohnsitz nach Homburg, wo ich nach weiteren drei Semestern das Physikum ablegte. Während der klinischen Semester studierte ich weiter in Homburg. Am Ende des Sommersemesters 1967 erhielt ich bei Herrn Professor Dr. med. Dr. phil., Dipl.-chem. W. Zimmermann am Institut für Hygiene und Mikrobiologie eine Doktorarbeit, die ich in der folgenden Zeit bearbeitete.

Nach elf Semestern Medizinstudium legte ich das Staatsexamen mit dem Prädikat "Sehr gut" ab.

Dortmund, den 17. Februar 1970